

文章编号 1007-9564(2012)09-1407-04

## 弥漫性脑损伤后 SD 大鼠内耳 HO-1、iNOS 蛋白与 mRNA 的表达

付兴华 邓艳丽 卢鹤翔 张萍 孙瑞军  
刘颖 赵君晖 顾洪兰 韩莉 张再兴\*

**摘要** 目的 利用 Western Blot、RT-PCR 技术,探讨 SD 大鼠弥漫性脑损伤后,耳蜗 HO-1、iNOS 蛋白与 mRNA 表达及对 ABR 的影响。方法 建立弥漫性脑损伤大鼠模型并随机分组,采用听性脑干反应测定、Western Blot、RT-PCR 技术,观察各组动物听性脑干反应变化及耳蜗 HO-1 与 iNOS 的表达。结果 外伤后各组 ABR 阈值及各波潜伏期、波间期比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。HO-1、iNOS 蛋白与 mRNA 在外伤后各组耳蜗内表达变化明显,光密度值比较均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 耳蜗功能的改变可能与 HO-1 与 iNOS 蛋白与 mRNA 表达升高有关,认为 HO-1、iNOS 基因与蛋白水平的改变,在内耳损伤与抗损伤机制中二者共同构成了重要调节机制。

**关键词** 弥漫性脑损伤;HO-1;iNOS;耳蜗;Western Blot;RT-PCR;听性脑干反应

弥漫性脑损伤(diffuse brain injury, DBI)后常伴随着并发症的发生,听力损伤即其中之一,发生率在 7%~50%<sup>[1]</sup>。目前就血红素加氧酶-1(Heme Oxygenase-1, HO-1)与一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, iNOS)在 DBI 导致内耳听功能损伤方面的研究,国内外鲜见报道。我们采用 Western Blot、RT-PCR 技术对 DBI 致内耳听功能损伤后 HO-1 与 iNOS 的蛋白与 mRNA 表达进行了研究,从蛋白与 mRNA 角度了解 HO-1、iNOS 表达与 DBI 之间的关系,进一步探讨 DBI 致内耳损伤的发生机制。

### 1 材料与方 法

**1.1 实验动物及分组** 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 150 只,体重在 250~270g,随机分为五组,正常对照组和外伤 1 周组、2 周组、3 周组、4 周组,每组各 30 只。实验动物由中国医学科学院实验动物研究所提供(编号:SCXK(京)2006-0003),实验大鼠均在 SPF 级动物饲养中心,应用 Co60 辐照饲料分笼饲养。

**1.2 模型的制作与听功能检测** 参考 Feeney 法<sup>[2]</sup>

复制动物模型,按正常组、1,2,3,4 周组时间点,采用美国 ICS medical 公司生产 MCV-90XP 型听性脑干反应仪(Auditory Brainstem Response, ABR)按时间点测试 ABR 后断头处死动物,获取耳蜗标本分别用 10%多聚甲醛固定和-80℃冰箱保存耳蜗标本备用。

**1.3 主要试剂与仪器** HRP 耦联的山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG、ECL 超敏试剂盒、RIPA 组织细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒,购于碧云天生物技术公司。石蜡包埋组织 RNAout 试剂盒、双酶一管式 RT-PCR 试剂盒 CAT#:91202-50, DNA 电泳分子量标准(NAMETER),HO-1 上下游引物、iNOS 上下游引物购于北京天恩泽基因科技有限公司,EPC 处理的无 RNA 酶水、DNAMarker,血红素氧合酶兔抗,货号:AB1284、一氧化氮合酶兔抗,货号:#06-573,购于美国密理博(Millipore)公司,PCR 仪 MJ 公司 PT-200 型、紫外分光光度计、电泳仪、酶标仪、Motic 彩色病理图像分析系统。

### 1.4 蛋白与 mRNA 提取

**1.4.1 蛋白提取** 取内耳标本加 RIPA(用前加入 PMSF 至终浓度为 1mmol)组织裂解液捣碎,冰上裂解 40min,4℃离心 15min,取上清液-20℃保存。蛋白浓度测定:取样本 2 $\mu$ l,测定样本蛋白浓度,计算每个样本的蛋白含量;绘制标准曲线,调整样品蛋白量为 30 $\mu$ g,取 80 $\mu$ l 样品加入 5 $\times$ 上样缓冲液 20 $\mu$ l,使成终浓度为 1 $\times$ ,混匀后 100℃变性 5min,4000 转离心 5 min。将制备好的样品 20 $\mu$ l 加入上样孔中,电

基金项目:河北省科技厅科技支撑项目(08276101D-74)

作者单位:063000 河北省唐山市,河北联合大学附属医院耳鼻喉科(付兴华、邓艳丽、张萍、赵君晖、顾洪兰、韩莉、张再兴);河北联合大学形态中心(卢鹤翔、孙瑞军);河北联合大学附属医院肿瘤科(刘颖)

\* 通讯作者

泳初始电压 60V,样品入分离胶后电压升至 90V 继续电泳。至溴酚蓝带泳动到接近胶底部时停止电泳,用时约 2.5h,下胶;冰浴恒压 60V 转膜 3h,转膜完毕后 5% 脱脂奶粉封闭 1h。一抗孵育:根据 Marker 标识裁取 GAPDH、HO-1、iNOS 条带,并转入相应含 HO-1、iNOS 与 GAPDH 的一抗抗体稀释液(1:1000)中 4℃ 过夜。二抗孵育:PBS 洗膜 3 次,每次 10min。将 GAPDH 膜转入 HRP 标记的山羊抗鼠抗体稀释液(1:5000)中,将 HO-1、iNOS 膜转入山羊抗兔抗体稀释液(1:2000)中,37℃ 孵育 1h。PBS 洗膜 3 次,每次 10min。ECL 液处理: ECL 液覆于膜上反应 1min 后压片曝光、显影。应用 Motic 彩色病理图像分析系统成像分析。

**1.4.2 mRNA 提取** 按照石蜡包埋组织 RNAout 试剂盒使用手册提取 mRNA 于 -80℃ 保存,取 2μl 标本测定总 RNA 浓度,计算总 RNA 含量,决定加样量。引物系列:HO-1 上游引物序列:HO-1 上游引物序列:5'-AGCATGTTCCCAGGATG-3',

下游引物序列:5'-GCTCAATGTTGAGCACA-3', NOS 上游引物序列:5'-GAGATCAATG-GCAGCTGT-3',下游引物序列:5'-AGAATG-GAGATAGGACGT-3'。RT-PCR:按照双酶一管式 RT-PCR 试剂盒使用手册操作,将各组分别加入反应体系中混匀,置 PCR 仪进行逆转录、扩增,RT 条件设定为 42℃ 30min,94℃ 变性 5min 后进入 PCR 循环,94℃ 1min,54℃ 30s,72℃ 30s,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10min。RT-PCR 结束后取 10μl 进行电泳。本实验采用聚丙烯酰胺凝胶电泳,0.1% AgNO<sub>3</sub>、2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 显染。将泳胶浸泡水中至照相并分析结果。

**1.5 图像分析** 应用 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统分析各组大鼠耳蜗蛋白、mRNA 条带光密度(Optical density OD 值)。

**1.6 统计学方法** 应用 SPSS 13.0 统计学软件进行数据分析,各测定值以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异采用单因素方差分析,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

表 1 弥漫性脑外伤 SD 大鼠五组 V 波阈值(dB nHL)、PL、IPL(ms)比较( $\bar{x} \pm s, n=60$ )

组别	V 波阈值	I 波 PL	III 波 PL	V 波 PL	I-III 波 IPL	III-V 波 IPL	I-V 波 IPL
正常对照组	1.17±2.13	0.64±0.05	2.12±0.11	3.99±0.21	1.48±0.08	1.87±0.13	3.36±0.18
DBI 1 周组	18.5±7.83 <sup>a</sup>	0.71±0.06 <sup>a</sup>	2.28±0.16 <sup>a</sup>	4.34±0.24 <sup>a</sup>	1.57±0.13 <sup>a</sup>	2.05±0.15 <sup>a</sup>	3.62±0.21 <sup>a</sup>
DBI 2 周组	17.83±8.35 <sup>a</sup>	0.68±0.05 <sup>ab</sup>	2.23±0.11 <sup>ab</sup>	4.25±0.19 <sup>ab</sup>	1.54±0.08 <sup>a</sup>	2.02±0.17 <sup>a</sup>	3.57±0.17 <sup>a</sup>
DBI 3 周组	16.00±7.12 <sup>ab</sup>	0.68±0.05 <sup>ab</sup>	2.18±0.10 <sup>ab</sup>	4.18±0.17 <sup>abc</sup>	1.51±0.08 <sup>a</sup>	2.00±0.11 <sup>abc</sup>	3.51±0.14 <sup>abc</sup>
DBI 4 周组	15.42±7.21 <sup>ab</sup>	0.67±0.05 <sup>ab</sup>	2.16±0.12 <sup>ab</sup>	4.15±0.22 <sup>abc</sup>	1.50±0.09 <sup>a</sup>	1.98±0.15 <sup>abc</sup>	3.48±0.19 <sup>abc</sup>
F 值	64.665	15.868	16.288	23.674	8.796	14.441	18.618
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a 与正常对照组比较  $P<0.05$ ;b 与外伤 1 周组比较  $P<0.05$ ;c 与外伤 2 周组比较  $P<0.05$

表 2 HO-1 与 iNOSmRNA 表达组间比较(OD 值)( $\bar{x} \pm s, n=60$ )

组别	HO-1mRNA (OD 值)	iNOSmRNA (OD 值)
GAPDH	0.25±0.01	0.25±0.01
正常对照组	0.35±0.05	0.28±0.01
DBI 1 周组	0.49±0.03	0.35±0.03
DBI 2 周组	0.47±0.01	0.33±0.01
DBI 3 周组	0.46±0.05	0.31±0.03
DBI 4 周组	0.43±0.04	0.30±0.01
F 值	131.396	76.594
P 值	0.000	0.000

注:各组比较  $P$  均  $<0.05$

## 2 结果

**2.1 ABR 检测结果** 各组实验动物在处死前均行 ABR 检测,各组实验动物均能清楚测试出 ABR V 波阈值、波峰潜伏期(Peak latency, PL)及各波峰间潜伏期(Interpeak latency, IPL),并能获取满意数

据。组间比较,外伤后 1,2,3,4 周组 ABR V 波阈值均明显高于正常对照组,差异有统计学意义  $P$  均  $<0.05$ 。外伤各组 PL、IPL 与对照组均明显延长差异有统计学意义  $P$  均  $<0.05$ ; DBI 后 1 周组与 2 周组在 I 波 PL、III 波 PL、V 波 PL 比较;与 3 周组、4 周组 V 波阈值、I 波 PL、III 波 PL、V 波 PL、III-V IPL、I-V IPL 比较;2 周组与 3 周组、4 周组 V 波 PL、III-V IPL、I-V IPL 比较,差异有统计学意义 ( $P$  均  $<0.05$ ),见表 1。

**2.2 HO-1 与 iNOS mRNA、蛋白检测结果** 经 RT-PCR mRNA 半定量聚丙烯酰胺凝胶电泳银染显示条带内参显示清晰,各测试组条带特点:正常对照组 mRNA、蛋白电泳条带显色较弱,而 DBI 各组条带显色明显,并呈现 1W-4W 组条带显色由深变浅逐渐过渡现象(图 1-6)。mRNA、蛋白电泳条带 OD 值分析,HO-1 与 iNOS mRNA F 值分别为 131.396,76.594,HO-1 与 iNOS F 值分别为 151.301,588.225。经单因素方差分析,其 mRNA、

蛋白表达正常对照组与 DBI 各组 OD 值之间比较均有统计学意义  $P < 0.05$  (表 2,3)。

表 3 HO-1 与 iNOS 蛋白表达组间比较 (OD 值) ( $\bar{x} \pm s, n=60$ )

组别	HO-1 蛋白 (OD 值)	iNOS 蛋白 (OD 值)
GAPDH	0.77 ± 0.11	0.77 ± 0.11
正常对照组	0.18 ± 0.03	0.15 ± 0.03
DBI 1 周组	0.79 ± 0.28	0.70 ± 0.09
DBI 2 周组	0.55 ± 0.12	0.50 ± 0.05
DBI 3 周组	0.45 ± 0.09	0.37 ± 0.08
DBI 4 周组	0.31 ± 0.06	0.29 ± 0.07
F 值	151.301	588.225
P 值	0.000	0.000

注: 各组比较  $P$  均  $< 0.05$

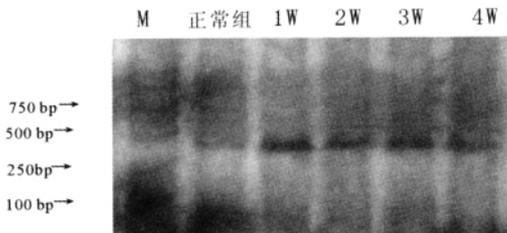


图 1 HO-1 基因 PCR 扩增产物凝胶电泳结果

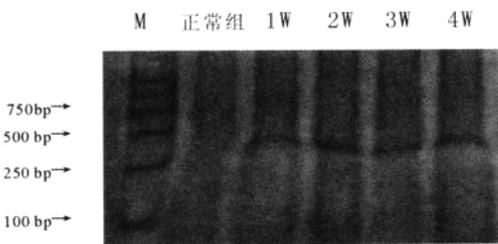


图 2 iNOS 基因 PCR 扩增产物凝胶电泳结果

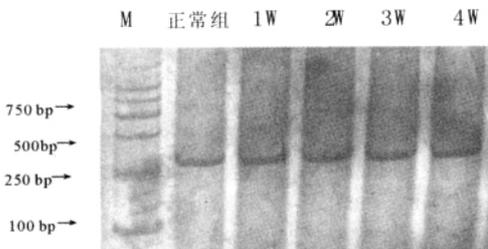


图 3 GAPDH 电泳结果

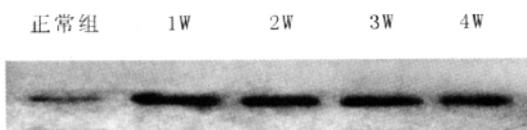


图 4 HO-1 蛋白电泳结果

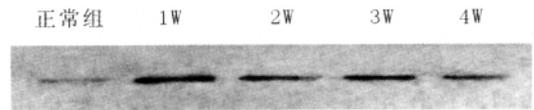


图 5 iNOS 蛋白电泳结果

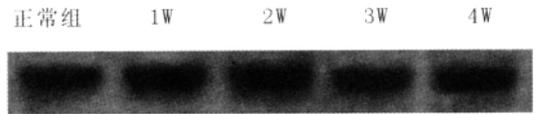


图 6 GAPDH 蛋白电泳结果

### 3 讨论

HO-1 与 iNOS 二者均为诱导型酶, 在生理状态下不表达<sup>[3]</sup>, 而二者分别可被多种有害刺激所诱导<sup>[4]</sup>, 如氧化应激反应、炎症、免疫因子等<sup>[5]</sup>。在我们以往研究中发现, DBI 不仅直接造成实验动物的听觉神经传导通路受到不同程度损伤和耳蜗听功能损伤外, 经免疫组化检测证实, 在耳蜗组织内 DBI 同时也可引起 HO-1、iNOS 的表达增高。就其听力损失与听觉神经传导通路传导时程延长, 经 ABR 检测发现, DBI 各组听力损失、ABR V 波阈值、PL、IPL 明显较正常对照组升高与延长, 改变以 DBI 后 1W 组最为明显, 但随着时间延长, 伤后 ABR V 波阈值、PL、IPL 损伤逐渐减轻, V 波阈值、PL、IPL 等虽有缓解, 但仍明显高于正常对照组, 同时这与 HO-1、iNOS 上调表达的转归趋势关系相一致, 为进一步证实 HO-1、iNOS 上调表达是否与分子水平有关, 我们应用 Western Blot 与 RT-PCR 技术进行了相应研究与观察。实验结果发现, 正常对照组与 DBI 各组蛋白与 mRNA 的表达量呈现不一, 正常对照组 HO-1 mRNA 表达 OD 值为  $0.35 \pm 0.05$ , iNOS mRNA 表达 OD 值为  $0.28 \pm 0.01$ , 正常对照组 HO-1 蛋白表达 OD 值为  $0.18 \pm 0.03$ , iNOS 蛋白表达 OD 值为  $0.15 \pm 0.03$ , 伤后各组 HO-1、iNOS 蛋白与 mRNA 表达明显高于正常对照组。HO-1、iNOS 蛋白与 mRNA 在 DBI 早期耳蜗内呈现高表达状态, 结果分析显示, HO-1 和 iNOS 蛋白和 mRNA 表达, 在 DBI 后随不同时间点而表达的结果不同, 特别是 mRNA 与蛋白的表达在伤后 1W 时最为明显, 而在 DBI 后 2, 3, 4 周时间点则表达逐渐减弱, 表达虽有下降, 但仍较正常对照组表达明显, 因此认为蛋白与 mRNA 的表达可能与受伤时间点有关。同时表达变化的过程与耳蜗听觉功能改变形式基本相一致。认为可能是由于蛋白与 mRNA 水平出现异常, 而直接导致细胞内 HO-1、iNOS 在细胞内的表达也随之发生改变, 这一变化已在我们以往实验中得以证实。就两者在体内代谢过程中, HO-1 催化血红素

生成 CO, 而 iNOS 则在细胞受到各种病理刺激时才开始表达, 使细胞产生大量 NO<sup>[6]</sup>, 有研究表明 NO 的病理损伤作用可能是由于它能够和氧自由基反应, 而生成氮的过氧化物, 后者的氧化性很强, 并通过阻滞线粒体的呼吸等作用, 发挥其细胞毒性作用, 而造成内耳螺旋器内毛细胞、外毛细胞的损害<sup>[7]</sup>, 而 HO-1 分解血红素, 避免了血红素对细胞的损伤, 催化过程中消耗了 O<sub>2</sub>, 减少了氧自由基生成. 在氧化应激中有效地清除氧自由基, 防止细胞脂质过氧化, 而对组织细胞起到保护作用<sup>[8]</sup>, 这可能是机体一种适应性保护机制, 以对抗氧化损伤及维持细胞凋亡与增殖的平衡<sup>[9]</sup>, 由于 NO 和 CO 在理化性质、分子结构和生物学作用方面有许多相似之处, 两者之间存在着错综复杂的相互作用<sup>[10]</sup>, 一方面 NOS 产生的 NO 能抑制 HO 的活性; 同时, NO 的自由基性质又能诱导 HO-1 的表达<sup>[11,12]</sup>, 由于 NO、CO 均能与亚铁血红素发生配位反应<sup>[13]</sup>, 两者相互制约与影响, 故有学者认为, HO-1 可能通过以下途径抑制 iNOS 的活性及产生, 减少对组织损伤: ① NOS 是一种血红素蛋白, 活性位点需要两个血红素分子, 而 HO-1 能够降解血红素, 从而减少 iNOS 的生成; ② NOS 属于细胞色素 p450 蛋白, p450 又是 HO-1 作用的底物, 因此 HO 活性增加能够促进 NOS 的降解; ③ HO-1 源性的 CO 可以直接与 iNOS 结合, 减少 iNOS 产生 NO 自由基; ④ HO-1 降解血红素释放的铁能通过核转入而抑制 NOS 的产生<sup>[14]</sup>. 我们观察的结果显示, 当 DBI 动物模型出现耳蜗损伤时, HO-1、iNOS 蛋白与 mRNA 表达均有明显升高, 而 HO-1 的表达强于 iNOS 的表达, 这一改变预示着 HO-1 在耳蜗损伤与抗损伤中可能起到了主导作用, 同时两者又共同参与这一过程, 由此认为 HO-1 与 iNOS 的相互作用已成为机体损伤与抗损伤的重要因素, 由两者共同构成了机体病理生理过程中的重要调节机制。

本实验观察发现, DBI 不仅可造成耳蜗听觉功能的损害, 而导致听力下降. 同时可能会引起耳蜗组织细胞内 HO-1 与 iNOS 的基因水平的变化, 而引发相关蛋白合成发生改变. 结果显示 HO-1 与 iNOS 蛋白和 mRNA 表达的变化, 可能在 DBI 导致

的内耳损伤机制中发挥着重要作用, 总之, 有关 HO-1、iNOS 基因与蛋白水平改变在内耳损伤机制中的作用还有待更进一步研究与考证。

#### 4 参考文献

- [1] Nolle C, Todt I, Seidl RO, et al. Pathophysiological changes of the central auditory pathway after blunt trauma of the head [J]. *J Neurotrauma*, 2004, 21(3): 251-258
- [2] Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, et al. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat [J]. *Brain Res*, 1981, 211(1): 66-77
- [3] Moro MA, Cárdenas A, Hartado O, et al. Role of nitric oxide after brain ischaemia [J]. *Cell Calcium*, 2004, 36(3-4): 265-275
- [4] 郭筱华, 赵忠新. 血红素加氧酶系统在神经系统疾病中变化的研究进展 [J]. *中国临床神经科学*, 2007, 15(2): 212-216
- [5] 周晓红, 韦鹏, 凌毅群, 等. 内源性 H<sub>2</sub>S 对 LPS 所致大鼠急性肺损伤时肺动脉高压的影响及其与一氧化氮的相互作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(4): 715-721
- [6] 周晶, 戴春富. 一氧化氮合酶抑制剂对大鼠耳蜗诱生型一氧化氮合酶 mRNA 表达的影响 [J]. *中国耳鼻咽喉科杂志*, 2008, 8(3): 151-153
- [7] 戚翔, 刘视星, 路虹, 等. 一氧化氮在顺铂耳、肾毒性中的作用 [J]. *陕西医学杂志*, 2010, 39(3): 265-267
- [8] 陆献成, 刘志勇. 血红素加氧酶-1 的研究及应用进展 [J]. *现代医学*, 2007, 35(1): 72-75
- [9] 刘大男, 吴立荣, 方颖, 等. 血红素氧合酶-1/一氧化碳与一氧化氮合酶/一氧化氮系统抑制球囊损伤后再狭窄的作用及其相关性研究 [J]. *微循环学杂志*, 2010, 20(3): 1-4, 7
- [10] 林宇, 郭恒怡. 血红素加氧酶和一氧化氮合酶在缺血性脑损伤时的保护作用 [J]. *国外医学脑血管疾病分册*, 2005, 13(8): 596-599
- [11] Hara E, Takahashi K, Takeda K, et al. Induction of heme oxygenase-1 as response in sensing the signals evoked by distinct nitric oxide donors [J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, 58(2): 227-236
- [12] Motterlini R, Foresti R, Bassi R, et al. Endothelial heme oxygenase-1 induction by hypoxia. Modulation by inducible nitric-oxide synthase and S-nitrosothiols [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(18): 13613-13620
- [13] 余少卿, 章如新, 陈英剑. 内源性一氧化碳对变应性鼻炎豚鼠诱导型一氧化氮合酶表达的影响 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2009, 44(12): 991-995
- [14] 张家涌, 段鸿洲, 鲍圣德. 一氧化氮合酶及血红素氧化酶在颈动脉粥样硬化斑块中的表达 [J]. *中华神经外科杂志*, 2008, 24(11): 868-871

[2012-08-03 收稿 — — 修回]